

ANTIOXIDANT

Patent number: JP2000204369
Publication date: 2000-07-25
Inventor: TSUMURA KAZUNOBU; NAKAMURA YASUSHI; KUGIMIYA WATARU
Applicant: FUJI OIL CO LTD
Classification:
- **international:** C09K15/34; A23J3/16; A23L3/3526
- **european:**
Application number: JP19990004674 19990111
Priority number(s):

Abstract of JP2000204369

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antioxidant suited for a practical use, having antioxidative effect for controlling autoxidation of oils and fats by making the antioxidant include a polypeptide prepared by separately hydrolyzing two kinds of specific components.

SOLUTION: This antioxidant comprises a polypeptide derived from soybean obtained by separately hydrolyzing a 7S component and a 11 S component. (A) The polypeptide constituent component comprises a polypeptide as a main component having 5,000-35,000 molecular weight by an analysis by a mercaptoethanol-containing SDS polyacrylamide gel electrophoresis method, (B) the main peak molecular weight of the polypeptide by gel filtration method is about 8,000, the ratio of the polypeptide having a molecular weight in the region of 5,000-30,000 is >=70% based on the whole peak area and the ratio of the polypeptide having a molecular weight in the region of <5,000 is <=20% and (C) 0.22M TCA dissolution ratio is 30-90%.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-204369

(P2000-204369A)

(43)公開日 平成12年7月25日 (2000.7.25)

(51)Int.Cl.
C 0 9 K 15/34
A 2 3 J 3/16
A 2 3 L 3/3526

識別記号
5 0 1

F I
C 0 9 K 15/34
A 2 3 J 3/16
A 2 3 L 3/3526

テマコード(参考)
4 B 0 2 1
4 H 0 2 5
5 0 1

審査請求 未請求 請求項の数2 O.L. (全6頁)

(21)出願番号 特願平11-4674

(22)出願日 平成11年1月11日 (1999.1.11)

(71)出願人 000236768

不二製油株式会社

大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号

(72)発明者 津村 和伸

茨城県筑波郡谷和原村網の台4丁目3番地
不二製油株式会社つくば研究開発センター内

(72)発明者 中村 靖

茨城県筑波郡谷和原村網の台4丁目3番地
不二製油株式会社つくば研究開発センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗酸化剤

(57)【要約】

【課題】油脂の自動酸化を抑止する抗酸化能を有する実用的な抗酸化物質を提供すること。

【解決手段】大豆蛋白中の主構成成分である7S成分、11S成分と共に含む低変性大豆蛋白質を基質にして2段階の酵素分解反応、即ち第一分解反応によって7S成分、そして第二分解反応によって11S成分を、或いはその逆に第一分解反応によって11S成分、そして第二分解反応によって7S成分をそれぞれ加水分解して得られるポリペプチドを含有する抗酸化剤。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 7S成分及び11S成分を別途に加水分解して得られるポリペプチドを含有する抗酸化剤。

【請求項2】 大豆に由来するポリペプチドであって、以下の諸性質を有するポリペプチドを含有する抗酸化剤。

1) ポリペプチド構成成分がメルカブトエタノールを含むSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析で、分子量5,000～35,000の範囲にあるポリペプチドが主体である。

2) ポリペプチドのゲルろ過法により主ピーク分子量が約8,000で、分子量範囲5,000～30,000が全ピークエリア面積の70%以上であり、分子量範囲5,000未満が全ピークエリア面積の20%以下である。

3) 0.22M TCA 可溶率で30～90%である。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリペプチドを含有する抗酸化剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より、油脂の自動酸化を抑止する抗酸化剤は、天然由来のものとしてトコフェロールやL-アスコルビン酸、合成物としてBHA（ブチルヒドロキシアニソール）、BHT（ジブチルヒドロキシトルエン）等が知られている。しかし近年、BHA、BHTなどの化学合成品は食品への使用頻度は低くなっている。一方で天然のL-アスコルビン酸は熱やアルカリに弱く、トコフェロールは脂溶性であることや高価であるので使用に制限がある。

【0003】大豆や大豆蛋白由来の抗酸化性物質としては大豆粕の分解物（特開平6-287554号公報）、大豆蛋白をペプシン分解して得られる特定のペプチド（特開平9-157292号公報）、大豆由来の蛋白分解物を魚類精巢成分と併用する（特開平10-219244号公報）等が知られている。その他の蛋白性の抗酸化物質としては乳蛋白の一種であるラクトフェリン由來のペプチドおよびその誘導体（特開平6-199687号公報、特開平8-176190号公報）が知られている。しかしながら、以上述べた試みでは、実験室レベルのものやその収量が非常に少ないと等の問題点があり、実用レベルには至っていないのが現状である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】以上の実情から本発明は、油脂の自動酸化を抑止する抗酸化作用を有する実用的な抗酸化性物質を提供することを課題とするものである。

【0005】

【課題を解決する為の手段】本発明者らは、上記問題解決について鋭意検討した結果、大豆蛋白中の7S成分及

2

び11S成分を別途に加水分解して得られるポリペプチドが、油脂の自動酸化を抑止する抗酸化作用が高いことを見い出し本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は大豆蛋白中の主構成成分である7S成分、11S成分を共に含む低変性大豆蛋白質を基質にして2段階の酵素分解反応、即ち第一分解反応によって7S成分、そして第二分解反応によって11S成分を、或いはその逆に第一分解反応によって11S成分、そして第二分解反応によって7S成分をそれぞれ加水分解して得られるポリペプチドを含有する抗酸化剤を提供するものである。

【0006】

【発明実施の形態】本発明の抗酸化剤は、以下に述べる特定の分解方法により得られたポリペプチドが含有された抗酸化剤により問題解決を行うところにその要点がある。すなわち、大豆蛋白中の主構成成分である7S成分、11S成分を共に含む低変性大豆蛋白質を基質にして2段階の酵素分解反応、即ち第一分解反応によって7S成分、そして第二分解反応によって11S成分を、或いはその逆に第一分解反応によって11S成分、そして第二分解反応によって7S成分をそれぞれ加水分解して得られるポリペプチドが上記問題を解決する上で有効であり、未分解の分離大豆蛋白や非選択的に加水分解された分解物、低分子のペプチド、アミノ酸では上記問題解決は困難である。

【0007】本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチドを調製する際に用いる大豆蛋白は、低変性のもので丸大豆もしくはヘキサン等の溶剤で脱脂された低変性脱脂大豆または、これらを水抽出した豆乳もしくは脱脂豆乳、更にはこれに酸を用いて等電点沈殿させて沈殿画分を回収する分離大豆蛋白が基質として例示できる。例えば分離大豆蛋白を基質に用いる場合では低変性脱脂大豆(NSI 60以上、好ましくはNSI 80以上)をpH6～9、好ましくはpH6.5～8.0の範囲で7倍～15倍加水し、60℃以下、好ましくは50℃以下で抽出し、オカラ成分を除去した脱脂豆乳を等電点沈殿させて沈殿画分を回収したものが好適である。また、これら脱脂大豆、脱脂豆乳、分離大豆蛋白は、その調製過程中又はポリペプチドに分解する前若しくは後においてフィチン酸を分解または除去操作されたものも有効である。

【0008】以下に本発明の抗酸化剤に有効であるポリペプチドを調製する特定の加水分解方法について詳述する。大豆蛋白中の11S成分を第一分解反応により選択的加水分解する場合は、上記の大豆蛋白を基質とし、1%～30%蛋白濃度の溶液に対して、蛋白加水分解酵素を基質固形分に対して0.001～1%、好ましくは0.01～0.5%の範囲で添加し、45℃以下、好ましくは30～40℃においてpH3.0以下、好ましくはpH1.8～2.5で、反応時間4時間以内の短時間、好ましくは10分～2時間に0.22M TCA 可溶率で10～50%となるまで反応するのが良い。反応温度が45

50

°Cを超えると11S成分以外に7S成分も同時に分解を受け易くなり11S成分の選択的な分解が困難となりまた、11S成分の分解物自体もより低分子化する為、抗酸化作用の低下が見られる。また、反応時間が長すぎて11S成分の分解物がより低分子化する為前記同様に好ましくない。ここで用いられる蛋白加水分解酵素はpH3.0以下で活性を示す蛋白加水分解酵素全般が適当であり、動物由来のペプシン、カテプシンや微生物由来の一連のアスパルチックプロテアーゼ類等の例えば「ニューラーゼF」、「プロテアーゼM」（天野製薬株式会社製）、「スマートームLP」（新日本化学株式会社製）等の市販酵素剤を用いることが出来る。中でもペプシンは好適である。

【0009】7S成分を第一分解反応により選択加水分解するには、上記の大豆蛋白を基質とし、0.5%～20%蛋白濃度の溶液に対して、蛋白加水分解酵素を基質固形分に対して0.001～0.5%、好ましくは0.01～0.5%の範囲で添加し、反応温度50°C以上、好ましくは55～85°CにおいてpH3.0より高いpH、好ましくはpH3.5～8.0で、反応時間2時間以内の短時間、好ましくは10分～30分程度で、0.22M TCA 可溶率で10～50%となるまで反応することで実施できる。ここで用いられる蛋白加水分解酵素は、50°Cを超え90°C未満、好ましくは55～85°Cにおいて蛋白質分解活性を有する酵素剤であることが必要である。これらは植物や動物臓器或いは微生物起源の市販酵素剤等その起源は特に限定されない。

【0010】第一分解反応終了後、反応液から選択的加水分解物を回収する場合は、pH分画が簡便で好適であり、11S成分の選択的加水分解物を回収する場合pH3～5、好ましくはpH3.5～4.5の範囲に調整し、7S成分の選択的加水分解物を回収する場合pH3～6、好ましくはpH3.5～5.5の範囲に調整し、選択的加水分解物を主体とする上清画分とし、未分解の画分を主体とする沈殿画分を遠心分離やフィルタープレス分離等で各々回収する。

【0011】次いで、第二分解反応について述べる。上述した第一分解反応後に分離して得られた沈殿画分（7S成分あるいは11S成分に富んだ画分）に加水して、第一分解反応とは異なる条件にて第二分解反応を行う。例えば11S成分を第一分解反応した後であると、45°Cより高い反応温度で7S成分に富んだ画分を第二分解反応する。この場合特にpH3.0以下、50°C以上で行うのが好適である。7S成分を第一分解した後であると、11S成分に富んだ画分を第二分解反応する。この場合特にpH3.0以下、反応温度45°C以下で行うことが好適である。尚、7S成分を第一分解反応し、11S成分に富んだ画分を第二分解反応する場合は、第一分解反応後の分離操作は必ずしも必要ではなく、第一分解反応液をそのまま第二分解反応に移すことも出来る。第二

分解反応に用いる蛋白分解酵素は反応pHで活性を持つものであれば良く、前述した酵素が例示される。反応時間は2時間以内の短時間、好ましくは10分～30分程度で、0.22M TCA 可溶率で10～50%程度に分解する。

【0012】このようにして第一分解反応で得られた分解物と第二分解反応で得られたポリペプチドを全量或いは任意の割合で混合して、本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチドが得られる。本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチドは、以下のような特徴的な物理化学的性質を有する。即ち、

1) ポリペプチド構成成分がメルカブトエタノールを含むSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析で、分子量5,000～35,000の範囲にあるポリペプチドが主体である。

2) ポリペプチドのゲルろ過法により主ピーク分子量が約8,000で、分子量範囲5,000～30,000が全ピークエリア面積の70%以上あり、分子量範囲5,000未満が全ピークエリア面積の20%以下である。

3) 0.22M TCA 可溶率で30～90%である。

【0013】本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチド構成成分の解析は、メルカブトエタノールを含むSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（以下SDS-PAGE）による公知の分析方法により可能であり、標準分子量マーカーの移動度から各ポリペプチドの分子量を評価でき、デンシトメーターによる定量も可能である。本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチドの主要構成成分は、典型的には、分子量約10,000、約20,000、約25,000、約29,000、約32,000からなるが、両画分を全量用いた場合に比べて、例えば11S成分を選択的に加水分解した画分を多く用いる時は上記のうち分子量10,000の成分が多くなり他の成分が少なくなるなど、両加水分解物の配合割合によっては多少現れにくい成分がある。

【0014】本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチドのゲルろ過法による分子量評価は、以下の条件で行った。条件) カラム：東ソー（株）製、SW3000XL (7.6 mm × 30 cm) 溶出液；1% SDS 及び0.2 M NaCl を含む25 mM 磷酸緩衝液（pH 7）を用い、流速0.8 ml/分で溶出。検出：220 nm の吸光度。分析するサンプルを上記溶出液に0.5%濃度（0.1%メルカブトエタノールを含む）で溶解後、2分煮沸して完全に溶解させて、分析に供した。尚、分子量既知の標準蛋白質の溶出時間をもとに、分子量評価を行った。本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチドは、5,000～30,000が全ピークエリア面積の70%以上であり、分子量5,000未満が全ピークエリア面積の20%以下である。

【0015】加水分解度は、上記SDS-PAGEにおいてもあ

る程度判断可能であるが、蛋白質の分解率として一般的に用いられる0.22M TCA（トリクロロ酢酸）可溶率を指標としても評価できる。本発明の抗酸化剤に有効なポリペプチドの0.22M TCA 可溶率は、30～90%、好ましくは40～90%が適当である。

【0016】本発明において抗酸化力の測定方法は以下の方法にて行った。測定サンプル溶液1.5ml(0.1M 煙酸緩衝液pH6.0にてサンプル0.1w/v%濃度に溶解したもの)とリノール酸溶液1ml(エタノールにリノール酸を1.4w/v%濃度に溶解したもの)をバイアル瓶に入れ、60℃、暗室下で保存した。経時的に保存サンプル溶液中のリノール酸の酸化程度をロダン鉄法にて測定した。即ち、保存サンプル溶液0.1mlに7.5%エタノール4.7ml、30%ロダンアンモニウム溶液0.1ml、20mM塩化第二鉄を含む3.5%塩酸溶液0.1mlを加え、正確に3分間反応させた後、500nmの吸光度を測定して酸化程度を判断した。

【0017】本発明の抗酸化剤は、上記のポリペプチドを含有するものであれば、その形態等は、水溶液またはペースト状、粉末状態等のいずれであっても構わない。油脂に対する上記のポリペプチドの使用割合は、乾燥ポリペプチド粉末の量に換算して0.005～20重量%、好ましくは0.01～5重量%の範囲で使用されることが好ましい。0.005重量%未満では、抗酸化効果が小さく、20重量%を越えて配合しても添加量に見合う抗酸化効果が発揮されず不経済になる。また予め本発明のポリペプチドを油脂及び乳化剤とともに、O/W乳化物乃至W/O乳化物として添加することも可能である。本発明の抗酸化剤には、その他に蛋白質、糖質、油脂、或いは他の天然抗酸化物質を併用することは任意である。蛋白質としては例えば大豆蛋白、小麦蛋白、とうもろこし蛋白、米蛋白等の植物由来の蛋白質、乳蛋白、卵蛋白、魚肉蛋白、畜肉蛋白等の動物由来の蛋白質及びそのペプチドが例示される。糖質としては例えば単糖、二糖及びオリゴ糖、さらに澱粉類やガム質等の多糖類の様な公知の糖質が例示される。油脂としては例えば大豆油、綿実油、ごま油、オリーブ油、バーム油、菜種油、ひまわり油等の植物由来の油脂及び乳脂、牛脂、豚脂、魚油等の動物由来の油脂の様な公知の油脂が例示される。他の天然抗酸化物質としては例えばトコフェロール、L-アスコルビン酸及びその誘導体、β-カロチン、ごま種子由来のセサモリノールやセサミノール、茶カテキンに含まれるエピガロカテキンガレート等が例示される。これらのポリペプチド以外の他成分は単独又は2種以上を併用できる。その合計は限定されないが、本発明のポリペプチドに対して50重量%未満で併用することが好ましい。以上述べたように本発明の抗酸化剤は油脂に抗酸化能を賦与することができるので食品、化粧品、医療品等の分野において適用される。

【0018】

【実施例】以下、実施例により本発明の実施様態を具体的に説明するが、本発明がこれらによってその技術範囲が限定されるものではない。

(ポリペプチドの調製例) 実施例で使用したT-1及び2のポリペプチドは、以下の方法で調製した。不二製油(株)製の低変性脱脂大豆フレーク(NSI 90)に40℃の温水10倍量を加え、これにNaOH溶液を加えてpH7.0に調整した。これを緩やかに攪拌して1時間抽出し、遠心分離機にて不溶画分のオカラと可溶画分の脱脂豆乳とに分離した。得られた脱脂豆乳に塩酸を加えてpHを4.5に調整し、生じた蛋白質沈殿物を遠心分離機にて回収し分離大豆蛋白カードを得た。次いで、分離大豆蛋白カードに加水し塩酸を加えてpH2.0、分離大豆蛋白10重量%に調製し、この溶液1Lに対してペプシン(日本バイオコン製)200mgを加え、37℃で30分間加水分解した(第一反応)。反応液を電気泳動で分析した結果、大豆蛋白中の11S成分は選択的に加水分解され、11Sに相当する移動度のバンドは消失し、11S成分に由来する分解物成分、および分解を受けていない7S成分に相当する移動度のバンドが認められた。反応液は、NaOH溶液を用いてpH4.5に調整し生じてくる沈殿を遠心分離機にて11S成分の分解物を含んだ上清画分と7S成分に富んだ沈殿画分(未分解の画分)とに分離した。なお、ペプシン分解物の反応液の最終0.22M TCA 可溶率は、25%、pH分画後の上清画分の最終0.22M TCA 可溶率は72%、pH分画後の上清画分の容量回収率は80%、pH分画後の上清画分の固体分回収率は24%であった。7S成分に富んだ沈殿画分(未分解の画分)は、加水し塩酸を加えてpH2.0、固体分7重量%に調製し、この溶液1Lに対してペプシン(日本バイオコン製)100mgを加え、60℃で20分間再度加水分解を行った(第二反応)。なお、ペプシン分解後の反応液の最終0.22M TCA 可溶率は46%であった。沈殿画分の反応液は、11S成分に由来する分解物成分を含んだ上清画分と混合し、混合液とし、その固体分に対して3重量%の水酸化Caを添加し、更にNaOH溶液を用いてpH6.5に調整し、これを140℃、7秒の高温短時間加熱処理を行った後室温まで冷却し不溶成分を5000Gにて10分間遠心分離した上清画分を噴霧乾燥させてポリペプチド(T-1)を調製した。得られたポリペプチドの組成は、粗蛋白質76%、灰分15%、水分5%であり、0.22M TCA 可溶率は70%で、固体物回収率で71%であった。上記の分離大豆蛋白カードに加水し塩酸を加えてpH3.5、分離大豆蛋白10重量%に調整し、この溶液1Lに対してペプシン(日本バイオコン)200mgを加え、70℃で30分間加水分解した(第一反応)。反応液を電気泳動で分析した結果、大豆蛋白中の7S成分は選択的に加水分解され、7S成分に相当する移動度のバンドは消失し、7S成分に由來する分解物成分、および分解を受けていない11S成分に相当する移動度のバンドが認められた。

するポリペプチド成分、および分解を受けていない11S成分に相当する移動度のバンドが認められた。反応液を37℃まで冷却して塩酸を加えてpH2.0に調整し、ペプシン200mgを加え、37℃で30分間加水分解した(第二反応)。この反応液の固形分に対して3重量%の水酸化Caを添加し、更にNaOH溶液を用いてpH6.5に調整し、これを140℃、7秒の高温短時間加熱処理を行った後室温まで冷却し不溶成分を5000Gにて10分間遠心分離にて除去し、混合上清画分を得、これを噴霧乾燥させてポリペプチド(T-2)を調製した。得られたポリペプチドの組成は、粗蛋白質80%、灰分12%*

*%、水分5%であり、0.22M TCA 可溶率は65%で、固体物回収率で68%であった。

【0019】(実施例1及び2)上記調製例で得たポリペプチドT-1及びT-2を用いて、前述した評価方法にて、抗酸化能を評価し結果を表1に示した。

【0020】(比較例1及び2)比較として、分離大豆蛋白「フジブロ-E(商品名:不二製油社製)」(比較例1)、酵素分解大豆ペプチド「ハイニュートS(商品名:不二製油社製)」(比較例2)を実施例と同様にして抗酸化能を評価し、表1に結果を示した。

表1 リノール酸の酸化程度の変化(500nmの吸光度)

サンプル	保存日数1日	保存日数2日	保存日数3日
T-1 (実施例1)	0.06	0.13	0.18
T-2 (実施例2)	0.07	0.15	0.21
分離大豆蛋白(比較例1)	0.45	0.60	0.78
大豆ペプチド(比較例2)	0.25	0.40	0.55
プランク(無添加)	0.62	0.80	1.20

表1より本発明のポリペプチドが良好な抗酸化剤であることが判る。

【0021】(実施例3、4)上記調製例で得たポリペプチドT-1及びT-2の5重量%水溶液100g、大豆精製油100g、ポリグリセリン縮合リシノレン酸エステル(坂本薬品社製、商品名:「SYグリスターCR-S-75」)2gを混合し、ホモジナイザーで10000※

※0 rpm、3分間混合(40℃)して、W/O型乳化物を調製した。それぞれの乳化物を大豆油に対して4重量%になるように添加(大豆油に対してポリペプチド濃度が1000ppm)して、強制劣化試験を実施した。即ち、110℃にてCDM試験(メトロームシバタ社製、「ランシマットE679型」)にて抗酸化力を測定し、結果を表2に示した。

表2 大豆油に対する抗酸化力

サンプル	大豆油に対する添加量 (ppm)	誘導時間 (hr)
T-1 (実施例3)	1000	6.1
T-2 (実施例4)	1000	6.2
プランク(無添加)	0	4.5

表2より本発明のポリペプチドが良好な抗酸化能があることが判る。また、トコフェロール(添加量500ppm)と比較しても略同等の効力があった。

【0022】(実施例5及び比較例3)上記調製例で得★

★たポリペプチドT-1を用い、表3に示した配合でマーガリンを製造した(実施例5)。比較としてポリペプチドT-1を脱脂粉乳に代えて同様にマーガリンを製造した(比較例3)。

表3 配合表
(重量%)

大豆硬化油(融点34°C)	3.2
綿実硬化油(融点34°C)	1.7
大豆サラダ油	2.1
T-1又は脱脂粉乳	1
食塩	1
モノグリセリド	0.2
レシチン	0.2

ソルビタン脂肪酸エステル	0.2
β-カロチン	0.002
水	27.398

得られた各マーガリンのAOM試験、即ちPOVが100に達するまでの時間を測定し、その酸化安定性を評価した。結果、脱脂粉乳を用いた場合（比較例3）が、43時間であったのに対して、ポリベブチドT-1を用いた場合（実施例5）では、70時間であり、酸化安定性*

*に侵れていた。

[0023]

【発明の効果】 油脂の自動酸化を抑止する抗酸化作用を有する実用的な抗酸化性物質を提供することが可能となった。

フロントページの続き

(72)発明者 釘宮 渉

茨城県筑波郡谷和原村緑の台4丁目3番地
不二製油株式会社つくば研究開発センター内

F ターム(参考) 4B021 LW08 MC03 MK01 MK05 MK23

MP01

4H025 AA41 AC04 BA01